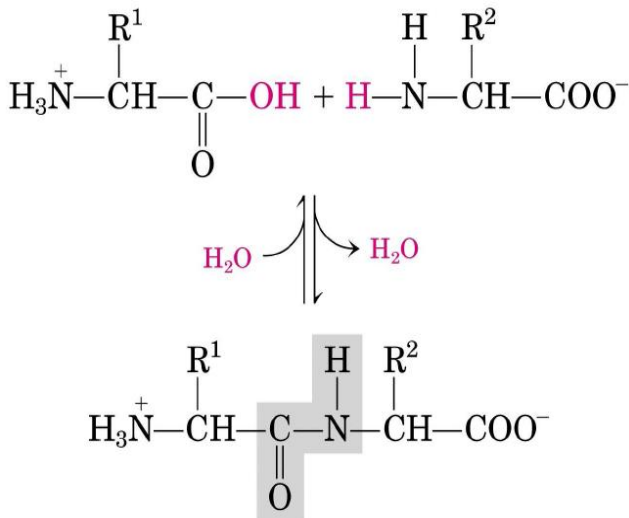


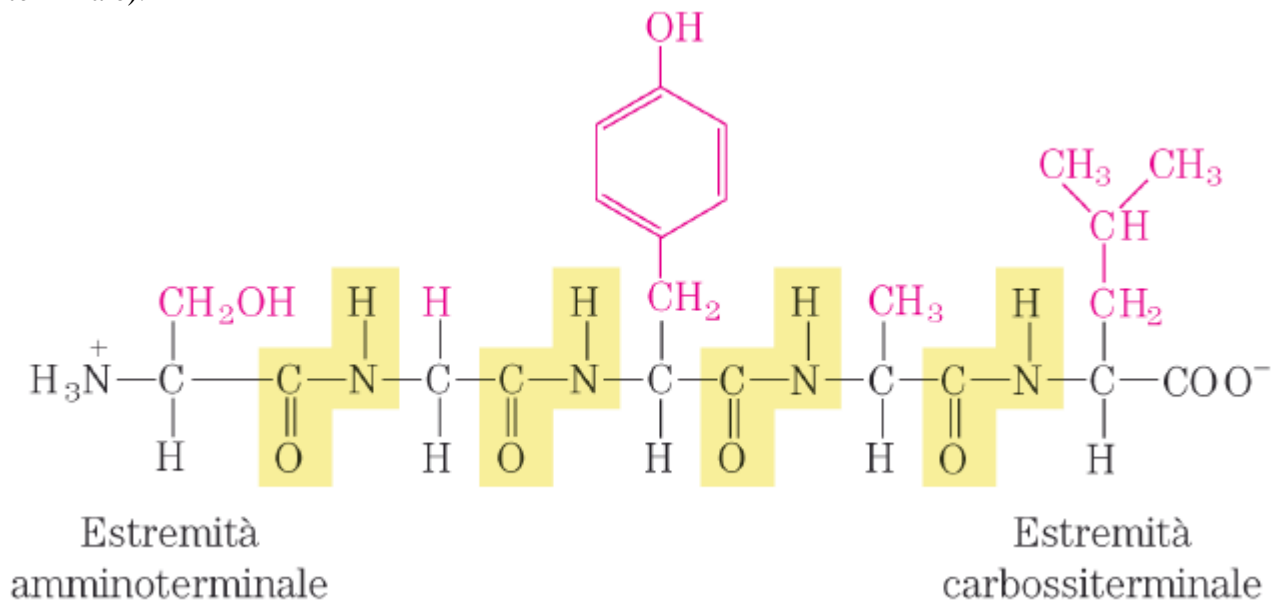
PEPTIDI



terminale).

Gli aminoacidi si legano tra di loro attraverso una reazione che coinvolge COOH di un aminoacido e NH₂ di un altro aminoacido, con la liberazione di una molecola di acqua per ogni legame formato. Il legame covalente che si forma prende il nome di legame peptidico.

Il peso molecolare di una proteina è uguale alla somma dei pesi molecolari degli aminoacidi che la compongono, togliendo i pesi molecolari di tutte le molecole d'acqua eliminate per formare i legami. La formazione dei legami comporterà la formazione di due estremità del peptide: l'estremità ammino-terminale (N-terminale) e l'estremità carbossi-terminale (C-

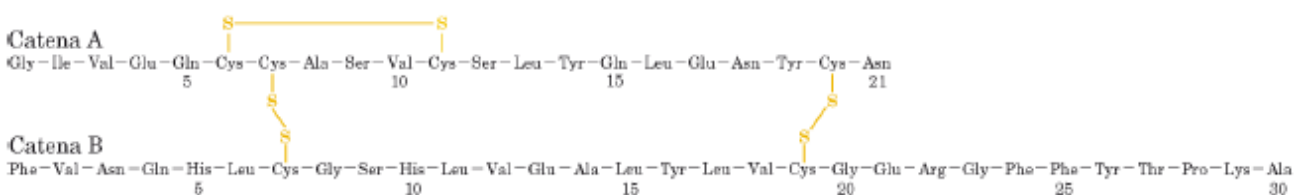


CLASSIFICAZIONE DEI PEPTIDI

Le proteine possono essere classificate in base al numero di aminoacidi di cui sono composte:

- Dipeptide (due aminoacidi)
- Tripeptide (tre aminoacidi)
- Tetrapeptide (quattro aminoacidi)
- Oligopeptide (circa venti aminoacidi)
- Polipeptide (oltre venti aminoacidi)

LEGAMI



I legami che si possono trovare in una proteina sono molteplici e ogni legame è diverso dagli altri per lunghezza ed energia:

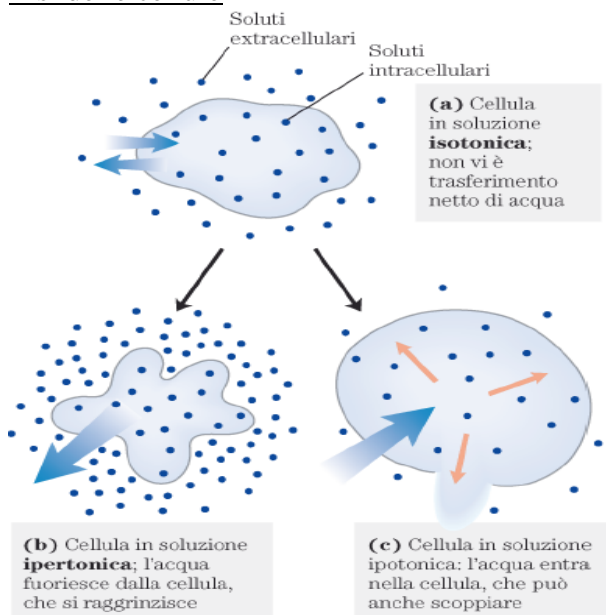
- Legame peptidico: è un tipo di legame covalente che differisce per caratteristiche dal classico legame ammidico. Il legame peptidico è più forte di un comune legame covalente C-C, poiché ha la tendenza ad assomigliare a un doppio legame a causa di una differenza di cariche parziali tra N e O.
- Ponte disolfuro (legame SH): è un tipo di legame covalente che si forma tra le catene laterali di cisteina di diverse subunità proteiche.
- Ponte idrogeno (legame H): è un tipo di legame polare molto debole che si forma tra H e un atomo molto elettronegativo (es. O e N).

PURIFICAZIONE DI UNA PROTEINA

Il processo di purificazione di una proteina segue diverse fasi:

- 1) Lisi delle cellule
- 2) Estratto grezzo
- 3) Frazionamento
- 4) Dialisi
- 5) Separazione delle proteine

Lisi delle cellule



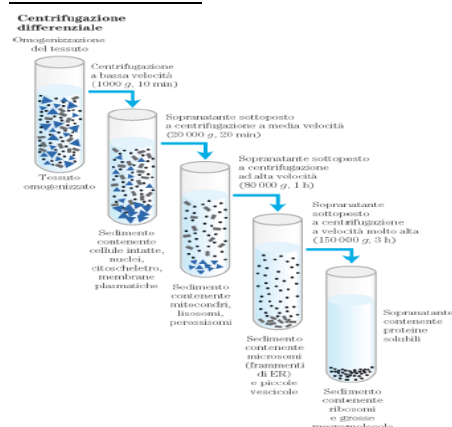
La lisi delle cellule consiste di rompere la membrana plasmatica delle cellule per far uscire il citoplasma con gli organuli. Sono tre le tecniche di lisi cellulare:

- Omogeneizzazione
- Ultrasuoni
- Lisi ipotonica

Estratto grezzo

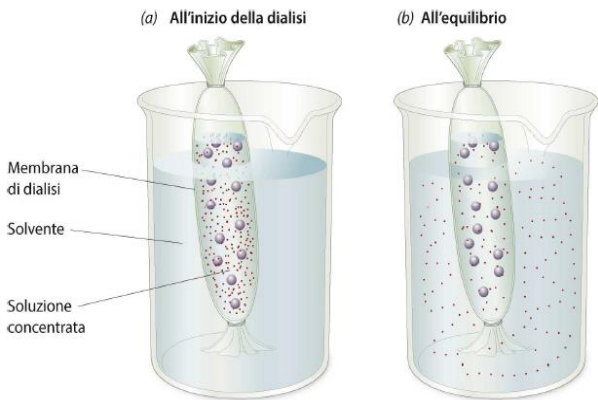
L'estratto grezzo è il citoplasma con gli organuli così come esce dalla cellula.

Frazionamento



Il frazionamento è il processo con cui vengono separate le componenti pesanti da quelle leggere con una centrifugazione frazionata, quindi con l'utilizzo di una centrifuga.

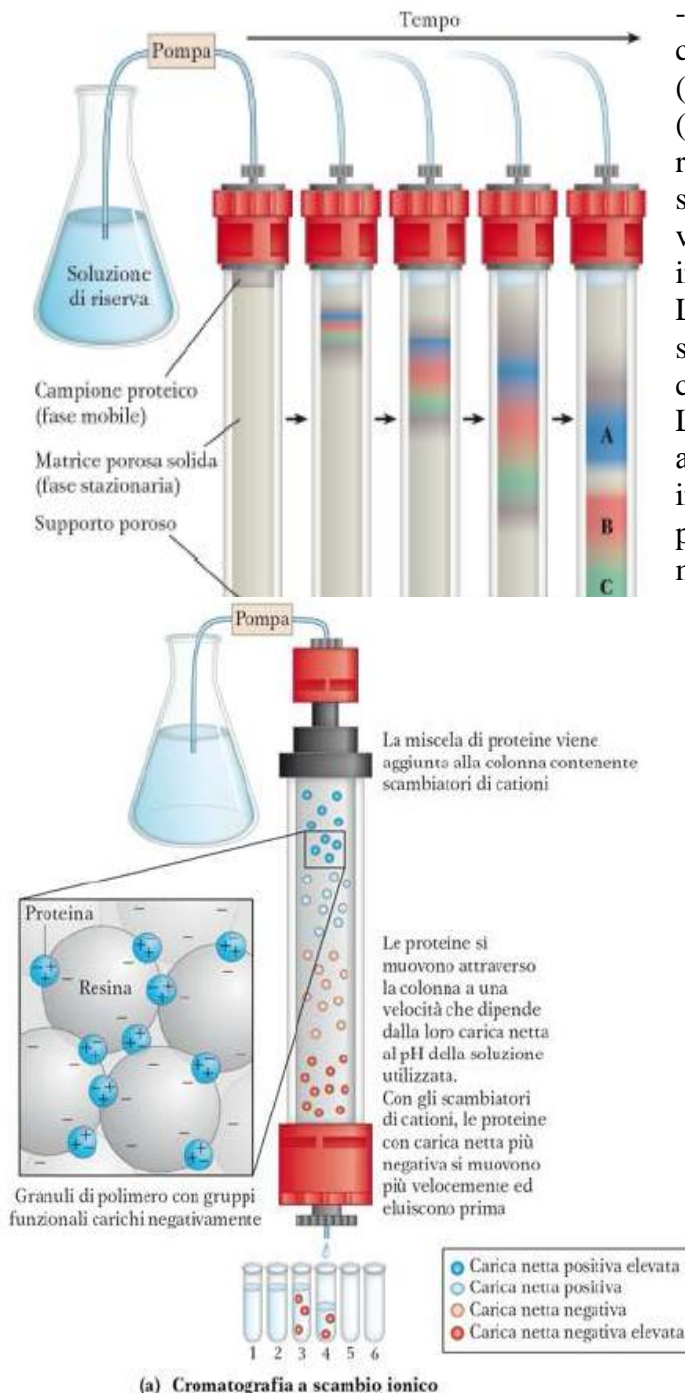
Dialisi



La dialisi ha la funzione di allontanare i composti di piccole dimensioni da quelli di grandi dimensioni. Si utilizza un sacchetto con pori con una soluzione concentrata e le proteine in un becher con un solvente. In questo modo le piccole particelle escono dai pori del sacchetto.

Separazione delle proteine

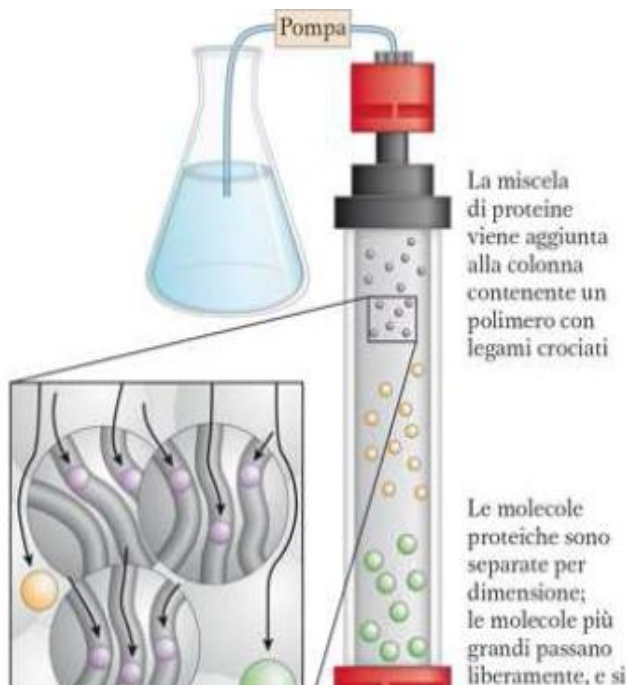
La separazione delle proteine l'una dalle altre è un processo che può essere mediato da diverse tecniche:



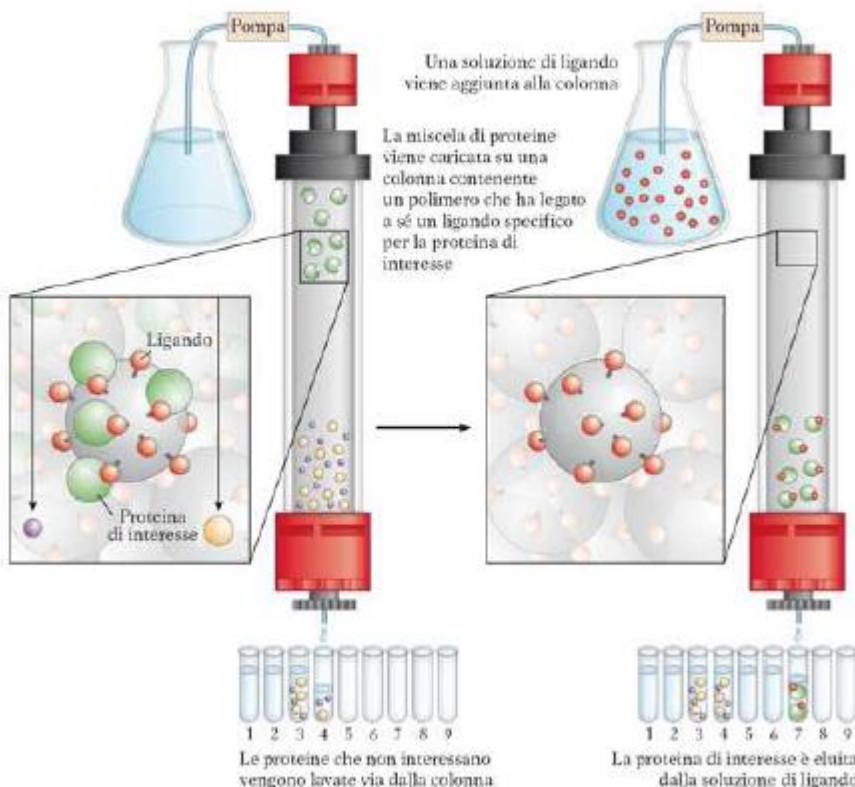
- Cromatografia su colonna: si utilizza una colonna di vetro in cui è inserita la matrice (materiale solido e poroso). Una soluzione (fase mobile) fluisce attraverso la matrice, che rappresenta invece la fase stazionaria. La soluzione che esce dal fondo della colonna viene rimpiazzata da una soluzione contenuta in un recipiente di riserva in cima alla colonna. La soluzione di proteina che devono essere separate viene stratificata sulla parte alta della colonna e la si lascia penetrare nella matrice. La soluzione proteica forma una banda all'interno della fase mobile, il cui spessore iniziale dipende dal volume della soluzione proteica caricata. Man mano che le proteine migrano attraverso la colonna, esse vengono rallentate in modo diverso, a seconda del grado di interazione con la matrice. La banda proteica complessiva tende quindi ad allargarsi, man mano che si muove lungo la colonna. Le varie proteine gradualmente si separano l'una dall'altra, formando bande discrete all'interno della banda più ampia che comprende l'intera gamma delle proteine. La separazione migliora se si aumenta la lunghezza della colonna, però anche le singole bande si allargano col tempo per effetto della diffusione di molecole.

- Cromatografia a scambio ionico: la miscela viene aggiunta alla colonna contenente scambiatori di ioni. Le proteine di muovo attraverso la colonna a una

velocità che dipende dalla loro carica netta al pH della soluzione utilizzata. Con gli scambiatori si ioni, le proteine con carica netta stessa a quella degli scambiatori si muovono più velocemente e fuoriescono prima.



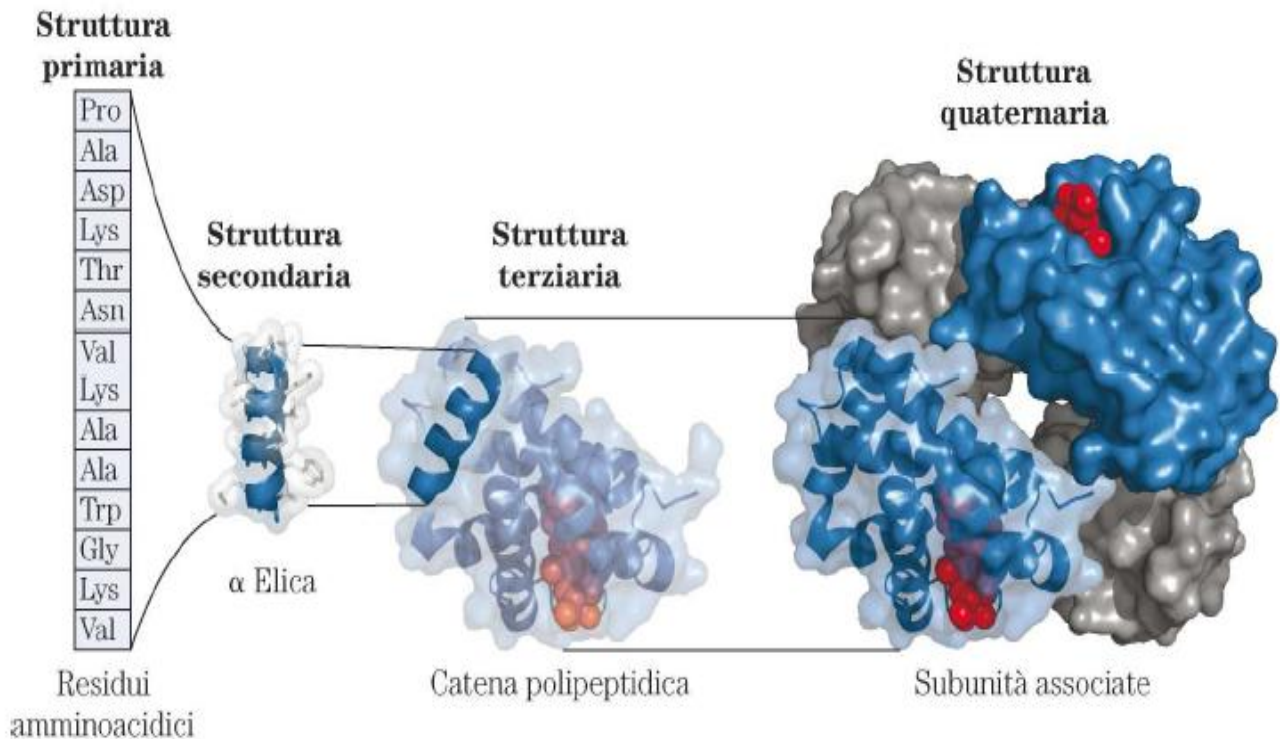
- Cromatografia per esclusione molecolare (gel-filtrazione): la miscela di proteine viene aggiunta alla colonna contenente un polimero con legami incrociati. Le molecole proteiche sono separate per dimensione: le molecole più grandi passano liberamente e si ritrovano nelle prime frazioni raccolte.



- Cromatografia per affinità: una soluzione di ligando viene aggiunta alla colonna. La miscela di proteine viene caricata su una colonna contenente un polimero che ha legato a sé un ligando specifico per la proteina di interesse.

STRUTTURE PROTEICHE

“Ad una sequenza di amminoacidi corrisponde una struttura. Ad una struttura corrisponde una funzione”. Le proteine non sono lineari, ma prendono conformazioni diverse in base alla quantità di amminoacidi con cui sono composte, al tipo di amminoacidi e all’ordine con cui questi sono legati. Esistono quattro strutture proteiche per descrivere le funzioni delle proteine e tutte queste strutture sono dipendenti dalla struttura primaria.



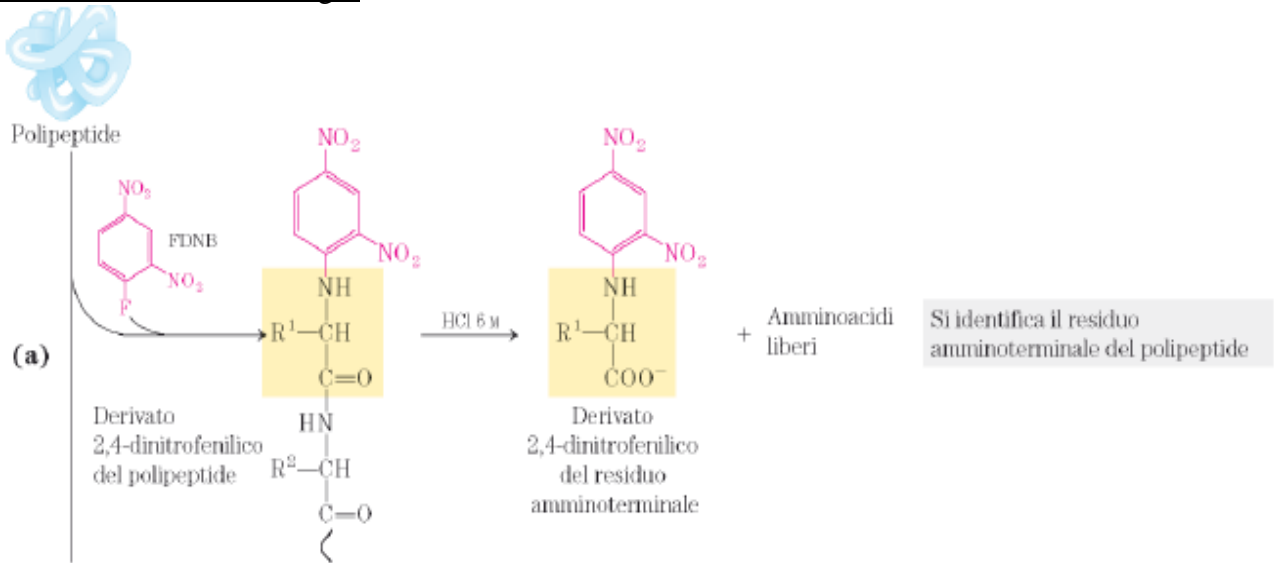
STRUTTURA PRIMARIA

La struttura primaria descrive la sequenza con cui sono disposti gli amminoacidi nella proteina. Le caratteristiche chimico-fisiche di una proteina ripiegano in modo diverso ogni proteina, si avranno così strutture tridimensionali diverse. Alcune malattie genetiche sono causate da una struttura primaria alterata, cioè quindi da problemi a livello amminoacidico; per esempio, l’anemia falciforme è causata dalla sostituzione della valina con il glutammato.

Scomposizione della proteina

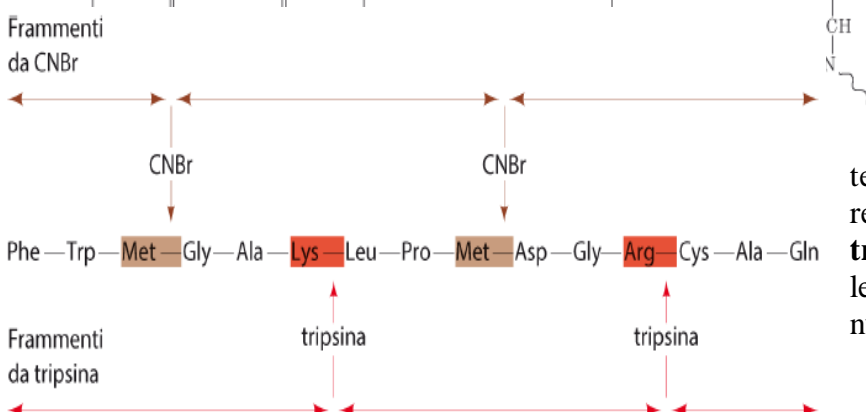
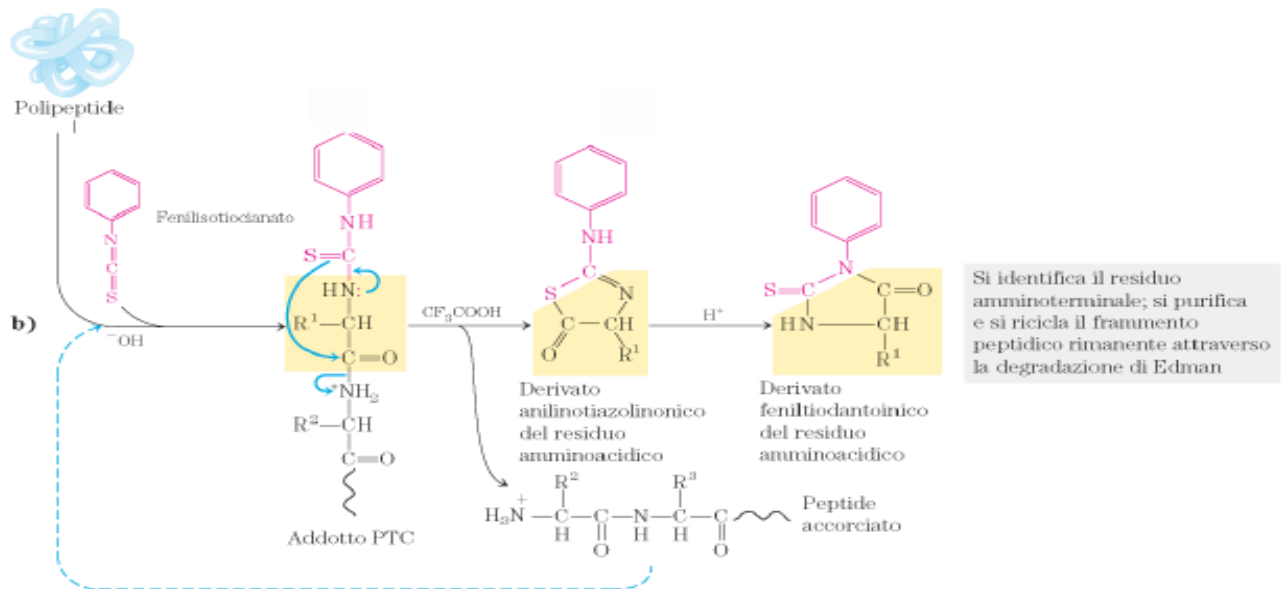
Una volta separate le proteine nel processo di purificazione, serve sapere la composizione amminoacidica, quindi si deve idrolizzare la proteina con una soluzione HCl/6M/110°C/24-48h, in modo tale che si rompano i legami peptidici per separare gli amminoacidi. Giunti a questo punto, si attua il processo di **derivatizzazione**, che consiste nel legare agli amminoacidi un composto che assorbe la luce a diverse lunghezze d’onda (es. la ninidra assorbe la luce a 570nm). Per capire a quale amminoacido corrisponde ogni picco, si usano amminoacidi standard singoli in cromatografia, successivamente si misura la curva prodotta da ogni amminoacido sul cromatogramma e si nota a quale essa corrisponde con gli amminoacidi standard.

Sistema di Frederick Sanger



Si fa reagire la proteina con il **fluoridinitrobenzene** e questo si lega all'estremità N-terminale con un legame che conferirà un assorbimento della luce a una certa lunghezza d'onda, data la caratteristica di fotoassorbimento del fluoridinitrobenzene. A questo punto l'estremità N-terminale viene separata dal resto del peptide. Se la proteina dovesse avere più unità legate, per esempio, da ponti disolfuro, si tratta la proteina con agenti riducenti come di **ditiotreitolo**, con la conseguenti rigenerazione delle cisteine e la separazione delle unità proteiche.

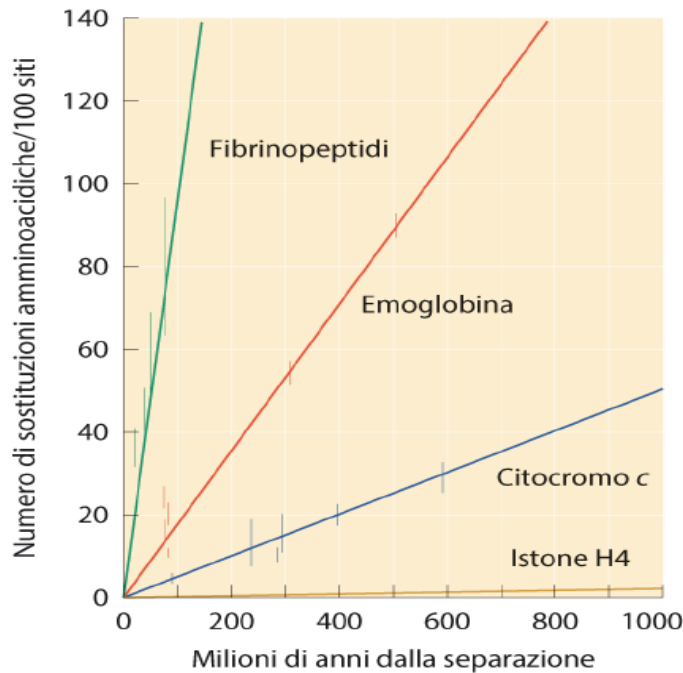
Degradazione di Edman



Si utilizza il **fenilisotiocianato** e, quando reagisce in ambiente alcalino, si lega al gruppo N-terminale. Successivamente si fa reagire la proteina con **acido-trifluoroacetico** per rompere il legame tra N e C e creare un nuovo gruppo N-terminale.

Questo metodo ha la possibilità di legare ogni amminoacido, perché, staccato uno, si ripete il processo con l'amminoacido successivo. La degradazione di Edman ha però solo il 90% di possibilità di riuscita, quindi si deve attuare più volte, e funziona solo su peptidi non più lunghi di 40 amminoacidi, quindi deve essere scomposto il peptide in segmenti più corti in due differenti modi:

- Metodo enzimatico: si utilizzano degli enzimi chiamati proteasi, come la tripsina, che demolisce i legami tra un qualsiasi amminoacido e la lisina o l'arginina, che sono carichi positivamente.
- Metodo chimico: si utilizza una sostanza chimica chiamata bromuro di cianogeno, che demolisce i legami tra un qualsiasi amminoacido e la metionina.



funzione di questa proteina è poco importante.

Famiglie proteiche

Comparando la sequenza primaria delle proteine si può parlare di famiglie di proteine che sono omologhe e, che quindi, hanno la stessa funzione pur avendo una composizione amminoacidica differente (simile, ma differente).

Le proteine, nel corso dell'evoluzione, sono cambiate, perché è cambiato il DNA, e quindi i geni, che danno inizio al processo di sintesi. Alcune proteine modificate causano danni all'organismo, mentre altre mantengono la stessa funzione, senza alcuna alterazione. L'istone H4 ha sostituito pochi amminoacidi in 1 miliardo di anni, quindi contiene amminoacidi importantissimi per il suo funzionamento; i fibrinoeptidi hanno sostituito centinaia di amminoacidi, quindi la

Domini proteici

In alcune proteine si possono riscontrare sequenze amminoacidiche identiche chiamate **domini** o **moduli**, che si ripetono più volte nel peptide. Ogni dominio si può ripiegare autonomamente dal resto della proteina, conferendo diverse funzioni a questa.

STRUTTURA SECONDARIA

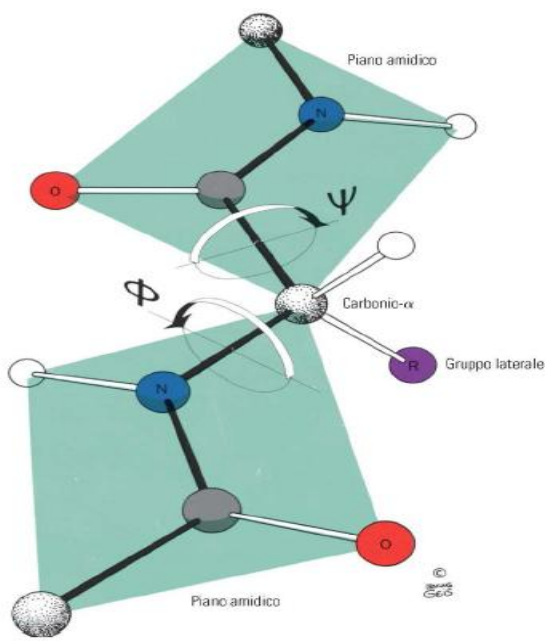
La struttura secondaria descrive la sequenza degli amminoacidi tenendo conto solo dello scheletro di una proteina, quindi senza tenere conto delle catene laterali.

Nello scheletro di una proteina si hanno tre legami:

- C_{α} -CO
- CO-NH
- NH- C_{α}

Angoli di rotazione

La rotazione dei legami determina la struttura secondaria e gli unici legami che possono ruotare sono NH- C_{α} (forma un angolo ϕ) e C_{α} -CO (forma un angolo ψ). La disposizione nello spazio di questi due angoli determina la struttura secondaria. Gli angoli ϕ



e ψ possono assumere valori da -180° a $+180^\circ$ e sono valori che possono differire da quelli precedenti o successivi in un peptide.

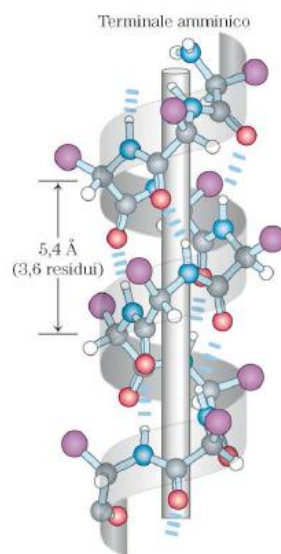
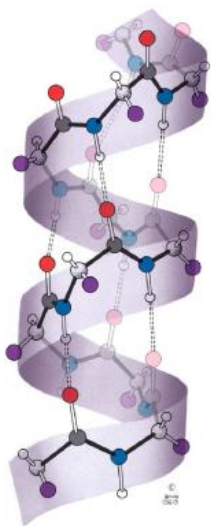
Esistono diverse conformazioni della struttura secondaria:

- Random coil
- α -elica
- Filamento- β
- Foglietto- β
- Ripiegamento- β

Random coil

E' una struttura irregolare, casuale, disordinata e senza forma.

α -elica

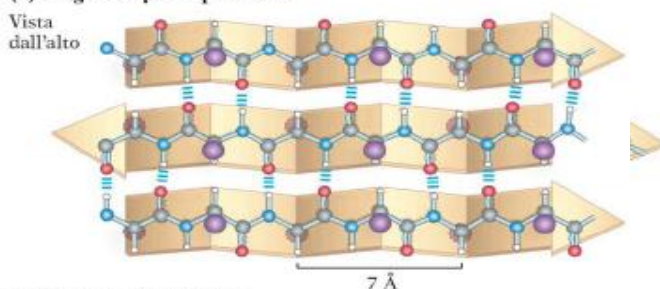


E' una struttura regolare con una forma di un'elica che si avvolge su un ipotetico asse centrale. La struttura ad elica è determinata dal **passo**, cioè dalla lunghezza tra due atomi che si trovano dalla stessa parte dell'elica, che ha un valore di circa 0,54nm con la presenza di circa 3,6 residui amminoacidici tra un passo e l'altro. Ad ogni passo si forma un ponte H tra CO e NH e ciò consente di stabilizzare ancora di più la struttura. I legami a H che si vengono a formare sono tutti paralleli all'asse centrale dell'elica. Le estremità N e C terminale non sono coinvolte nei legami a H, quindi si crea un dipolo con cariche opposti alle estremità opposte dell'elica. In tante proteine l'elica si interrompe per poi

riprendere, perché non tutti gli amminoacidi sono compatibili con l'elica a causa di diverse cause:

- La propensione intrinseca di un residuo amminoacidico a formare un'elica.
- L'interazione tra gruppi R, specialmente quelli che si trovano lontani 3/4 residui.
- L'ingombro sterico di gruppi R adiacenti.
- La presenza di prolina (l'anello a cinque non consente la formazione dell'elica) e glicina (la catena laterale è troppo corta).
- Le interazioni tra residui amminoacidici che si trovano alla fine del segmento dell'elica e il dipolo elettrico dell'elica.

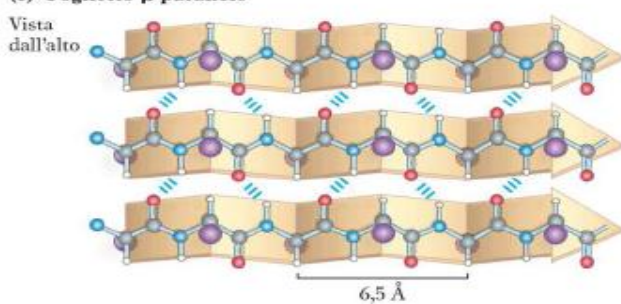
(b) Foglietto β antiparallelo



Filamento- β

E' una struttura regolare a zig-zag.

(c) Foglietto β parallelo



Foglietto- β

E' una struttura regolare composta da più filamenti- β legati tra di loro. Le catene laterali sono disposte in alternanza sotto/sopra. Se i

foglietti vanno nella stessa direzione saranno paralleli, altrimenti antiparalleli.

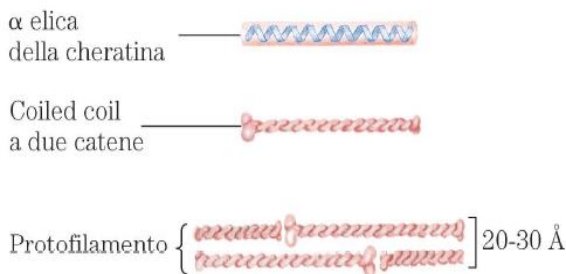
Ripiegamento-β

E' una struttura regolare che si crea quando un tratto di polipeptide si ripiega ad ansa. L'ansa è composta da 4 amminoacidi e tra il primo e il quarto si forma un ponte H.

STRUTTURA TERZIARIA

La struttura terziaria descrive la disposizione nello spazio di tutti gli atomi di una proteina. Non descrive solo lo scheletro carbonioso di un polipeptide, ma descrive anche le disposizioni assunte dalle catene laterali. Questa struttura è quella che maggiormente dà idea della forma della proteina. La struttura terziaria ottenuta è sempre quella termodinamicamente più stabile, infatti per stabilizzare la struttura terziaria si formano molte interazioni deboli, quali:

- Attrazioni elettrostatiche o ponti ad idrogeno, se gli amminoacidi trovano nella posizione corretta.



- Interazioni idrofobiche, da cui dipende il ripiegamento globale di una proteina. Infatti una catena polipeptidica può avere tanti amminoacidi idrofobici, i quali non possono presentare le loro catene laterali disposte verso l'esterno, in quanto sarebbero a contatto con l'acqua. Per questo motivo le proteine si ripiegano in modo tale da avere gli amminoacidi idrofobici rivolti verso l'interno, o confinati in una nicchia.



- Ponti disolfuro, i quali intervengono per stabilizzare ulteriormente la

struttura. In questo caso la catena polipeptidica è invitata a ripiegarsi in maniera tale da dare la possibilità alle cisteine di interagire mediante ponti disolfuro.

Relazione tra struttura terziaria e struttura secondaria

La struttura terziaria contiene al suo interno diversi elementi della struttura secondaria. Nella struttura terziaria di una proteina riconosciamo il ripetersi ed il ripresentarsi di diversi tratti con struttura secondaria nota. Ci sono alcune particolari associazioni di strutture secondarie riconoscibili all'interno di una proteina, che sono spesso ripetute. Ad esempio la struttura β-α-β. Non è raro trovare in una proteina un foglietto-β, formato dai due filamenti-β, uniti tra loro mediante ponti idrogeno, un'α-elica e due strutture random coil.

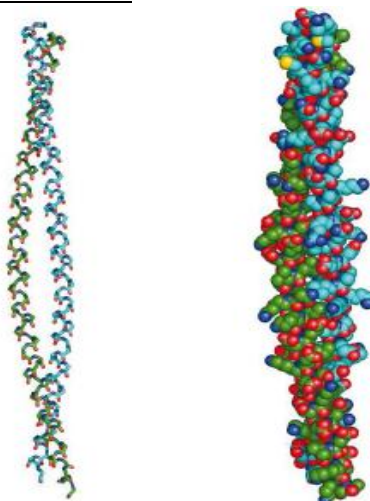
Un altro esempio di strutture terziarie particolari è rappresentato dal barile- β , formato da un gran numero di filamenti- β . La struttura terziaria non è solo un insieme delle strutture secondarie, per via del contributo delle catene laterali.

Nel definire la struttura terziaria, in genere, le proteine vengono divise in due grosse famiglie:

- Proteine fibrose: proteine la cui struttura terziaria assume una forma filiforme. Le proteine fibrose hanno funzioni strutturali, dando sostegno, forza e rigidità alla cellula. Spesso nelle proteine fibrose, non in tutte, si trova un unico tipo di struttura secondaria che si ripete per tutta la lunghezza della proteina. Un esempio di ciò è possibile notarlo nell' **α -cheratina**, nella fibra della seta, che presenta una struttura secondaria β -foglietto, e nel **collagene**.

- Proteine globulari: proteine che assumono dei ripiegamenti complessi, con forme chiuse su se stesse (sferiche o cilindriche). Le proteine globulari svolgono funzioni specializzate molto precise. Nelle proteine globulari non si troveranno mai solo un tipo di struttura secondaria.

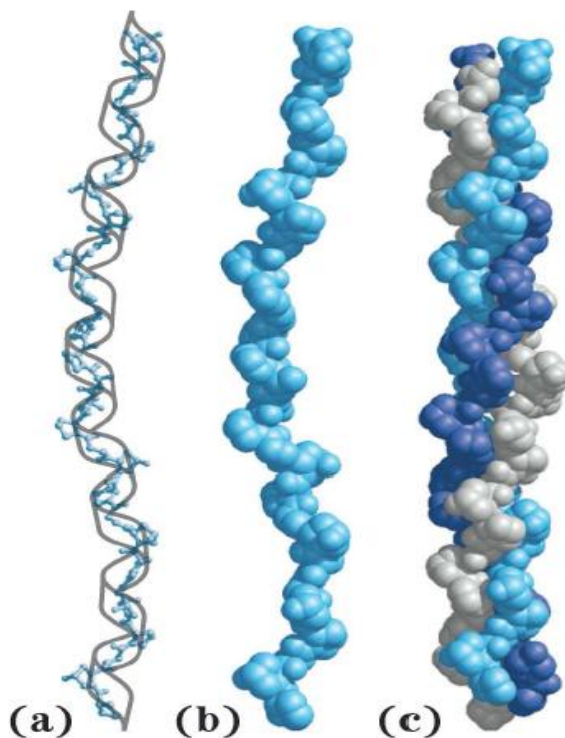
α -cheratina



L' α -cheratina è una proteina molto importante che riesce a donare durezza e resistenza alla tensione molto forte alle parti del corpo che compone. La struttura secondaria dell' α -cheratina è rappresentata da un α -elica, che si ripete ininterrottamente per tutta la lunghezza della proteina (particolarità dell' α -cheratina). Tendenzialmente la struttura secondaria dell' α -cheratina si avvolge attorno ad altro polipeptide che presenta una struttura ad α -elica. Questa struttura prende il nome di struttura **coiled-coil**. Questo tipo di struttura altro non è che l'esempio più semplice di struttura quaternaria, che descrive come catene polipeptidiche diverse si dispongono nello spazio tra di loro. Questo tipo di struttura si viene a formare quando le α -elica di due proteine sono sempre a contatto tra loro. Per formare una struttura coiled-coil queste due facce devono avere degli amminoacidi con strutture compatibili.

Tendenzialmente gli amminoacidi che formano le strutture coiled-coil sono amminoacidi idrofobici.

Collagene



Il collagene è una proteina fondamentale, che costituisce nel nostro organismo la cartilagine, i tendini e le ossa. La sua funzione è quella di donare resistenza alla tensione e ciò è reso possibile dalla particolare struttura assunta. Infatti il collagene è composto da un'unica catena polipeptidica, la cui struttura secondaria è regolare, in quanto assume una forma elicoidale. A differenza dell' α -elica, l'elica collagenica è sinistrorsa, inoltre è organizzata in maniera più lassa e si avvolge più stretta attorno all'asse centrale. Inoltre differisce dall' α -elica anche per gli angoli di legame ϕ e ψ , in quanto $\phi = -51$ e $\psi = +153$. Così come nel caso dell' α -cheratina, anche in questo caso troviamo un superavvolgimento dell'elica. In questo caso, però, tre eliche si superavvolgono l'un l'altra portando alla formazione della tripla elica collagenica, in cui lo spazio interno è molto ristretto. Questa particolare struttura terziaria è dovuta alla peculiarità della sequenza amminoacidica presente nella struttura

primaria. Infatti tutti i collagene hanno due caratteristiche peculiari:

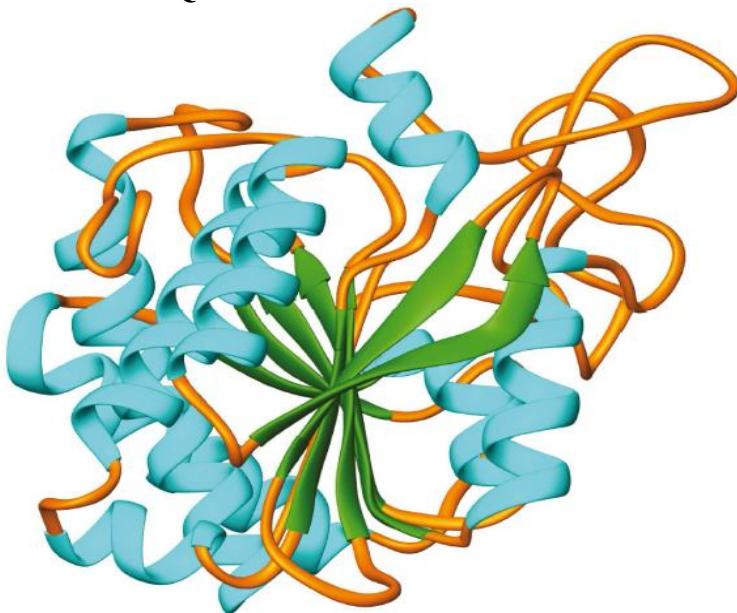
- Un terzo della struttura primaria è costituita da **glicina**, disposta con estrema regolarità, in quanto c'è un residuo di glicina ogni tre residui amminoacidici. La presenza di tutti questi residui di glicina è fondamentale nella tripla elica collagenica, in quanto lo spazio interno è molto limitato, per cui un amminoacido con una catena laterale ingombrante non troverebbe spazio. La glicina è l'unico amminoacido che può posizionarsi nello spazio interno della tripla elica collagenica, in quanto presenta una catena laterale molto piccola. Per questo motivo, tutta la faccia interna del canale centrale della tripla elica è costituito da dei residui di glicina.

- La presenza di molti residui di **prolina**. Molto spesso i residui di prolina sono modificati in 4-idrossiprolina, ossia una prolina che presenta un gruppo OH sul carbonio 4. La presenza di tutti questi residui di prolina induce la singola catena polipeptidica del collagene ad assumere una struttura elicoidale, a causa dell'ingombro sterico dovuto alle catene laterali della prolina. La disposizione elicoidale della catena tiene i residui della prolina il più lontano tra loro, evitando così l'ingombro sterico.

L'unità formatasi mediante l'assemblaggio di tre eliche, ossia la tripla elica collagenica, prende il nome di **tropo-collagene**. Nei tendini, nell'osso e nella cartilagine, il tropo-collagene tende ad associarsi con alte molecole di tropo-collagene creando delle fibre di collagene. Le fibre di collagene sono unite grazie ai ponti ad idrogeno, che si vengono a creare tra i gruppi OH dei residui di 4-idrossi-prolina, in quanto stabilizzano e legano i monomeri di collagene che formano la tripla elica.

La trasformazione del residuo di prolina in 4-idrossi-prolina all'interno della molecola di collagene è una reazione che richiede molti reagenti, tra cui la vitamina C, la quale assiste la prolina nell'idrossidazione. Carenze di vitamina C causano una ridotta idrossidazione nelle proline, quindi una ridotta capacità di stabilizzare le molecole di collagene all'interno della tripla elica, rendendo il collagene meno resistente.

STRUTTURA QUATERNARIA



Riguarda solo le proteine composte da più di una sub-unità e descrive solo il modo con cui le diverse sub-unità sono disposte tra loro nello spazio e che tipo di interazione le tiene unite. Ci sono proteine funzionali costituite da polipeptidi diversi associati tra loro. A volte le sub-unità possono essere due o più (anche 24 ad esempio). Le forze che tengono insieme le catene polipeptidiche sono sostanzialmente interazioni deboli (elettrostatiche e ponti idrogeno), molto meno rilevante interazioni idrofobiche, perché già nelle sub-unità sono disposti verso l'interno. Talvolta

anche ponti disolfuro, dovuto a cisteine su catene polipeptidiche diverse che possono ossidarsi e fare ponti disolfuro. Molto spesso la disposizione con cui diverse sub-unità si associano tra loro rispetta sempre dei piani di simmetria. La struttura quaternaria è tenuta insieme da interazioni deboli tra le sub-unità, la terziaria da interazioni deboli tra catene laterali e la struttura secondaria dipende da primaria. Tutti questi livelli della struttura terziaria dipendono dalla sequenza primaria, è dalla sequenza primaria che derivano tutte le informazioni utili alla proteina per poter disporre gli

amminoacidi in modo preciso per formare la struttura terziaria e quaternaria. La struttura terziaria e quaternaria di una proteina sono stabilite dalla struttura primaria.